



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



RUHAMA ESTEVAM ALVES

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANO E
CITOTÓXICO DE CUMARINAS

João Pessoa, 2014

Ruhama Estevam Alves

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANO E
CITOTÓXICO DE CUMARINAS**

Trabalho de conclusão de Curso
Apresentado ao curso de **Farmácia** do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, como
Requisito para conclusão do curso de
Farmácia. (Generalista)

Prof. Dr. Pablo Queiroz Lopes

Orientador

Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Co-orientadora

João Pessoa, 2015

A474i

Alves, Ruhama Estevam.

Investigação dos efeitos antibacteriano e citotóxico de
cumarinas / Ruhama Estebam Alves. - - João Pessoa: [s.n.], 2015.

40f. : il.

Orientador: Pablo Queiroz Lopes.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

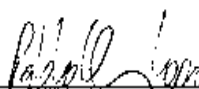
1. Antimicrobiano. 2. Citotoxicidade. 3. Amburana cearenses.
4. Cumarina.

RUHAMA ESTEVAM ALVES


**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIBACTERIANO E
CITOTÓXICO DE CUMARINAS**

APROVADA EM: 27 de Fevereiro de 2015

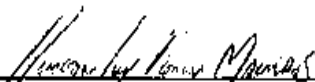
BANCA EXAMINADORA



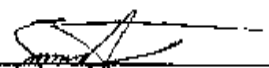
Prof. Pablo Queiroz Lopes - Orientador
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa - Co-orientadora
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira - Examinador
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Prof. Gregório Fernandes Gonçalves - Examinador
Faculdade Ciências Médicas - FCM

**Dedico a Deus,
Que permitiu essa realização.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço a minha mãe Aurivânia Estevam, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu pai, Jesiel Alves, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

A minha avó Marivan Maria pela contribuição valiosa.

Obrigada a toda família e amigos, que nos momentos de minha ausência dedicada ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

A professora Hilzeth Pessoa, pela orientação, apoio e confiança, mesmo no pouco tempo que lhe coube.

Ao meu orientador, Pablo Queiroz pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

A Gregório Gonçalves pela enorme ajuda, correções e incentivos.

Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Resumo

ALVES, Ruhama Estevam. **Investigação dos efeitos antibacteriano e citotóxico de cumarinas**. João Pessoa, 2015. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia Industrial) – Departamento de Ciências Farmacêuticas. UFPB, 2015.

Os produtos naturais biologicamente ativos podem ser de origem vegetal, animal e mineral, embora haja um predomínio de recursos vegetais. Estes representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular. *Amburana cearensis* é um gênero de plantas brasileiras, especificamente da região Nordeste conhecida popularmente como cumaru-do-ceará e amburana. As análises químicas e farmacológicas desta planta têm demonstrado a presença de cumarinas como um dos componentes químicos mais abundante provavelmente sendo este o responsável, juntamente com outras substâncias, pela ação benéfica das infusões das cascas. As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e *p*-hidróxi-cinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados por diferentes vias.

A potência dos antibióticos está ameaçada pela resistência bacteriana, aumentando a necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos. Os eritrócitos têm sido utilizados como modelo para avaliar a citotoxicidade de uma grande variedade de substâncias permitindo obter informação sobre os efeitos destas sobre a membrana celular. Dessa maneira o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de toxicidade de algumas cumarinas (1,2-benzopirona e a 4-coumarinol) foi realizada a determinação do potencial citotóxico frente a eritrócitos humanos dos grupos A, B e O, assim como, o potencial citotóxico frente a bactérias de importância clínica, que foi avaliado através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da técnica de microdiluição. As cumarinas de *A. cearensis* foram capazes de induzir hemólise em eritrócitos humanos pertencentes aos três tipos sanguíneos do sistema ABO, entretanto em porcentagens muito baixas, não comprometendo seu papel fundamental de transporte de gases no organismo. A 1,2-benzopirona e a 4-coumarinol, cumarinas de *A. cearensis* apresentaram efeito antimicrobiano frente as linhagens Gram positivas e Gram negativas com concentração inibitória mínima que variou entre 6,7µg e 200µg. Este resultado é relevante uma vez que bactérias Gram positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram negativas. A integridade da membrana celular depende do tônus celular e de substâncias que podem interferir na matriz da

membrana, todavia as cumarinas de *A. cearensis* não modificaram o funcionamento da membrana dos eritrócitos humanos.

Palavras-chave: Antimicrobiano, citotoxicidade, *Amburana cearensis*, cumarina.

ABSTRACT

ALVES, Ruhama Estevam . Investigation of antibacterial and cytotoxic effects of coumarin . João Pessoa, 2015. Working course completion (graduation in Industrial Pharmacy) - Department of Pharmaceutical Sciences . UFPB , 2015 .

Biologically active natural products can be of vegetable, animal and mineral, although there is a predominance of plant resources. These represent a rich source of biologically active compounds and are an example of molecular diversity. *Amburana cearensis* is a genus of Brazilian plants, specifically the Northeast popularly known as Cumaru-do-ceará and amburana. The chemical and pharmacological analysis of this plant have shown the presence of coumarins as one of the most abundant chemical components which is probably responsible, together with other substances, the beneficial effect of infusions of shells. Coumarins are derived from the metabolism of phenylalanine, taking as initial precursors cinnamic acid and p-hydroxy cinnamic acid, from which coumarins and their derivatives are biosynthesized by different routes. The potency of antibiotics is threatened by bacterial resistance, increasing the need for new drugs and new classes of antibiotics. The erythrocytes have been used as a model for evaluating the protective and toxic effects of a large variety of substances allowing to obtain information on the effects of the cell membrane. Thus the aim of the study was to evaluate the toxicity profile of some coumarins (1,2-benzopirone and 4-coumarinol) was conducted to determine the cytotoxic potential against human erythrocytes of groups A, B and O, as the cytotoxic potential against bacteria of clinical importance, which was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution technique. Coumarins *A. cearensis* were able to induce hemolysis of human red cells belonging to the three ABO blood types, however at very low percentages, not compromising its fundamental role of gas transport in the body. 1,2-benzopirone and 4-coumarinol, coumarins *A. cearensis* showed antimicrobial effect forward Gram positive and Gram negative strains with a minimum inhibitory concentration ranging between 6,7 μ g and 200 μ g. This result is relevant since Gram positive bacteria are generally more sensitive to antibiotics than gram-negative bacteria. The integrity of the cell membrane depends on the cell tone and substances that can interfere with the membrane matrix, however the coumarin *A. cearensis* did not change the operation of the membrane of human erythrocytes.

Keywords: Antimicrobial, cytotoxicity, *Amburana cearensis* coumarin

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Tabela 01 | Avaliação do efeito antibacteriano da 1,2-benzopirona de <i>A. cearensis</i> frente a bactérias de importância clínica. | 28 |
| Tabela 02 | Avaliação do efeito antibacteriano da 4-coumarinol de <i>A. cearensis</i> frente a bactérias de importância clínica. | 28 |
| Tabela 03 | Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de <i>A. cearensis</i> em eritrócitos humanos. | 39 |
| Tabela 04 | Porcentagem de hemólise promovida pela 4-coumarinol de <i>A. cearensis</i> em eritrócitos humanos | 31 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Gráfico 01 | Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de <i>A. cearensis</i> em sangue tipo A. | 30 |
| Gráfico 02 | Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de <i>A. cearensis</i> em sangue tipo B. | 30 |
| Gráfico 03 | Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de <i>A. cearensis</i> em sangue tipo O. | 30 |
| Gráfico 04 | Porcentagem de hemólise promovida pela 4-coumarinol de <i>A. cearensis</i> em sangue tipo A. | 31 |
| Gráfico 05 | Porcentagem de hemólise promovida pela 4-coumarinol de <i>A. cearensis</i> em sangue tipo B. | 31 |
| Gráfico 06 | Porcentagem de hemólise promovida pela 4-coumarinol de <i>A. cearensis</i> em sangue tipo O. | 32 |
| Gráfico 07 | Efeito da 1,2-benzopirona de <i>Amburana cearensis</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo A. | 32 |
| Gráfico 08 | Efeito da 1,2-benzopirona de <i>Amburana cearensis</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo B. | 33 |
| Gráfico 09 | Efeito da 1,2-benzopirona de <i>Amburana cearensis</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo O. | 33 |
| Gráfico 10 | Efeito da 4-coumarinol de <i>Amburana cearensis</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo B. | 34 |
| Gráfico 11 | Efeito da 4-coumarinol de <i>Amburana cearensis</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo A. | 34 |
| Gráfico 12 | Efeito da 4-coumarinol de <i>Amburana cearensis</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo O. | 35 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 01 | Imagem da Planta conhecida como <i>Amburana cearensis</i> | 19 |
| Figura 02 | Estrutura Química da 1,2-benzopirona, 4-coumarinol e Ácido o-hidroxicinâmico | 20 |
| Figura 03 | Imagem representando as diferenças estruturais entre bactérias Gram negativas e Gram positivas | 22 |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------|----|
| 1 . INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 18 |
| 3. OBJETIVOS..... | 24 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 24 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 36 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 37 |

1 INTRODUÇÃO

Ao usar produtos naturais bioativos como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos a indústria farmacêutica se depara, em geral, com a baixa concentração das substâncias selecionadas nas fontes naturais, o que muitas vezes inviabiliza a exploração comercial. Porém, a síntese destas substâncias e de derivados, permite frequentemente que se estabeleça o farmacóforo e que se avalie o perfil biológico, representando uma excelente oportunidade para a integração da química orgânica sintética e a química medicinal. Muitos produtos sintéticos em uso em clínica foram inspirados em produtos naturais (COSTA, 2009).

A natureza forneceu muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade (SAR) e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica. Os produtos naturais têm grande espaço e importância na indústria farmacêutica, seja por ele mesmo, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos.

A maioria dos antibióticos disponíveis atualmente são derivados de estruturas básicas introduzidas entre meados da década de 1930 e final da década de 1960, as novas gerações de antibióticos são, em sua grande maioria, resultantes de modificações químicas periféricas desses arcabouços já descritos (FISCHBACH, WALSH, 2009).

A OMS alerta para a diminuição de novas famílias de drogas antimicrobianas, que por muito tempo garantiam estarmos "à frente" dos patógenos, e para a escassez de incentivos para o desenvolvimento de novas drogas desse tipo. Aliado ao fato de que o tratamento de infecções bacterianas geralmente é curto, durando apenas alguns dias (o que não é rentável), o próprio mecanismo de resistência bacteriana é um fator que desmotiva a indústria, "porque sempre serão necessários novos antibióticos, o que demandaria investimentos contínuos" (KRUGER, 2010).

No mundo inteiro, há uma tendência ao desenvolvimento da resistência aos antibióticos, devido principalmente, ao uso incorreto dos mesmos. A produção de novos antibióticos está ocorrendo em um ritmo muito mais lento do que o surgimento das resistências bacterianas, deixando poucas alternativas terapêuticas para o tratamento dessas doenças, sendo necessário a iniciativa de pesquisadores na busca de novos agentes microbianos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Amburana cearensis (Fabaceae), conhecida popularmente por cumaru ou imburana-de-cheiro, é uma árvore de importância econômica, típica do sertão nordestino, onde é amplamente empregada em carpintaria, perfumaria e para fins farmacêuticos. A casca do caule, indicada para o tratamento de afecções respiratórias, é largamente utilizada na medicina popular no preparo de uma formulação caseira, chamada de "lambedor", e também na produção industrial do fitoterápico "xarope de cumaru". (SMITH, 2010)

Figura 01: Imagem da planta conhecida como *Amburana cearenses*.



1 - Disponível em:

<<http://www.onordeste.com/administrador/personalidades/imagemPersonalidade/55c703e5cd2d078458b1d76babe3d20054.jpg>> Acesso em mar. 2015.

A eficácia do uso popular de *A. cearensis* é comprovada por estudos farmacológicos a partir do extrato hidroalcoólico da casca do caule e de alguns de seus constituintes químicos, os quais demonstraram atividades analgésica, broncodilatadora e anti-inflamatória. Quimicamente, a casca do caule é basicamente constituída de cumarina, responsável pelo seu odor peculiar, dos flavonoides isocampferídio, campferol e afrormosina, pelos glicosídeos fenólicos amburosídeos A e B, dos ácidos fenólicos ácido vanílico e ácido protocatecuico, além de quantidades abundantes de

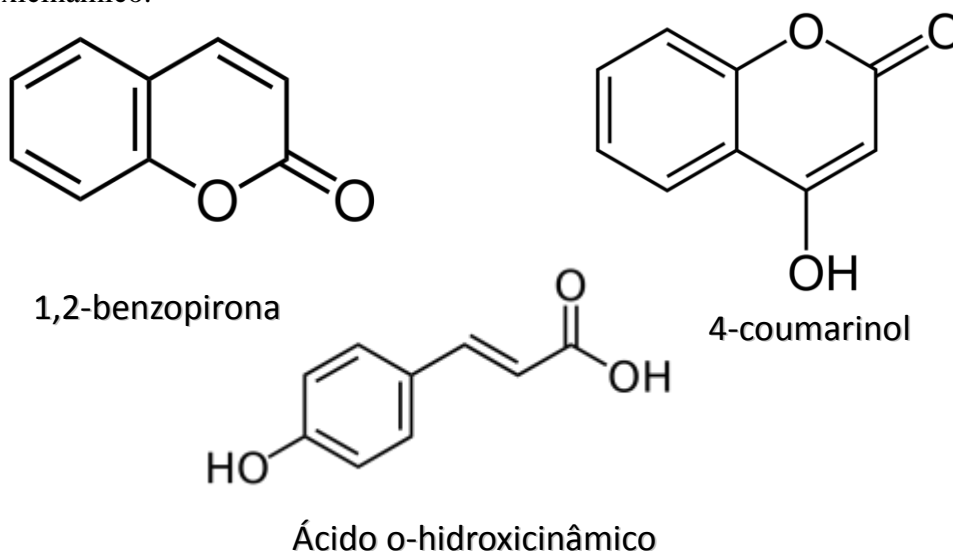
sacarose. Estudos recentes revelaram que a cumarina, o isocampferídio e o amburosídio A possuem efeitos anti-inflamatório, antioxidante e broncodilatador, sendo indicados como princípios ativos da planta.

As análises químicas e farmacológicas desta planta têm demonstrado a presença de cumarinas como um dos componentes químicos mais abundantes provavelmente sendo este o responsável, juntamente com outras substâncias, pela ação benéfica das infusões das cascas. (SMITH, 2010).

Por outro lado, a crescente demanda na exploração econômica de *A. cearensis*, causada pelo seu uso madeireiro e medicinal, tem provocado uma séria ameaça à sua sobrevivência, já que segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais - IUCN, esta espécie sofre risco de extinção. Além disso, sua congênere *A. acreana* consta na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Diante deste cenário, ações de conservação e aproveitamento sustentável da espécie foram delineadas e estão sendo executadas possibilitando a domesticação de *A. cearensis* através de cultivo por semeadura. Em testes farmacológicos pré-clínicos, extratos etanólicos de espécimes cultivados de *A. cearensis* demonstraram atividade anti-inflamatória equivalente ao da casca do caule. (SMITH, 2010).

As cumarinas são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo que o principal representante é a 1,2-benzopirona, denominada simplesmente de cumarina. Estes constituintes vegetais são derivados do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e *p*-hidróxi-cinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados por diferentes vias.

Figura 2: Moléculas de 1,2-benzopirona, 4-coumarinol e Ácido *o*-hidroxicinâmico.



As cumarinas utilizadas neste estudo são a 1,2-benzopirona, molécula mais simples, encontrada nas fontes naturais e a 4-coumarinol, um derivado semi-sintético da 1,2-benzopirona.

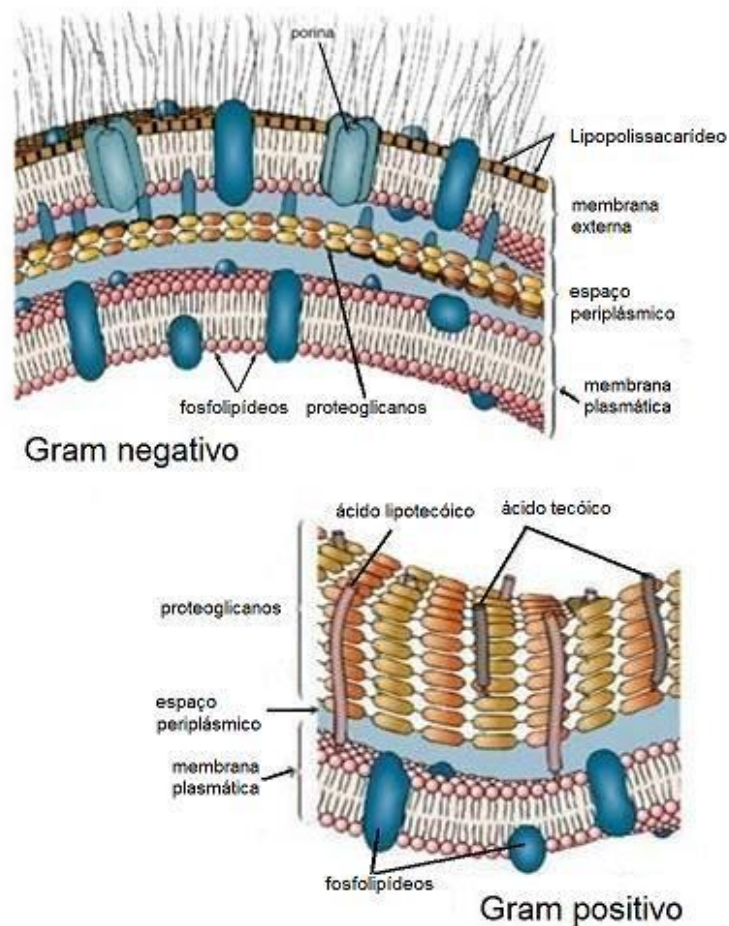
Outros estudos mostram ainda que várias cumarinas são inibidoras de lipoxigenases e cicloxigenases e reduzem consequentemente a produção de leucotrienos, tromboxanos e do ácido hidróxi-eicosanóico (KANEKO *et al.*, 2003). Outras importantes atividades farmacológicas descritas para as cumarinas incluem redução de edema em humanos, atividade imunossupressora, hipolipidêmica e antiinflamatória.

Os antibióticos são uma classe de fármacos indispensável. Sem eles os nascimentos prematuros seriam difíceis, a maior parte das cirurgias e dos transplantes seria impossível, terapias citotóxicas para o câncer levariam a infecções mortais e os hospitais se tornariam focos de doenças infecciosas.

Em resumo, sem eles haveria perdas na expectativa de vida que conquistamos ao longo de décadas. Mas a potência dos antibióticos está ameaçada, como vemos nos trabalhos de Neves *et al.*(10), Zanol *et al.*(17), Figueiredo *et al.*(3) e Santos Filho *et al.*(13). Há uma explosão de casos, não só de resistência a um fármaco, mas a muitos deles. A palavra *superbug* tem sido comumente usada para descrever organismos, que surgem em uma velocidade alarmante, resistentes a maior parte ou a todos os antibióticos clínicos em uso. O preocupante é que não há novas classes de antibióticos sendo desenvolvidas para ajudar na guerra contra as bactérias. As bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças na estrutura da parede celular. A parede das bactérias Gram positivas apresenta várias camadas de um polissacarídeo denominado peptidoglicano que forma uma rede através de ligações cruzadas entre seus aminoácidos além de pequenas quantidades de ácido teóico. As bactérias Gram negativas apresentam uma única camada de peptidoglicano e uma membrana externa complexa composta de lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas. Essas diferenças estruturais levam a modificações na permeabilidade o que acarreta variação na sensibilidade a substâncias exógenas. Normalmente as bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos antimicrobianos do que as Gram negativas embora alguns antimicrobianos atuem apenas em bactérias Gram negativas (MADIGAN; MARTINKO, 2004). De fato, o aumento da resistência bacteriana, principalmente entre

patógenos potencialmente perigosos, tem levado a um aumento na necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade.

Figura 03: Diferenças estruturais das bactérias Gram negativas e Gram Positivas.



3- Disponível em: <http://claraealinebioifef.wordpress.com/tag/gram-negativa/>, acessado em mar. 2015.

Embora os produtos naturais sejam amplamente considerados de menor risco em comparação com as drogas sintéticas, eles não são completamente livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos (DE SMET, 2004). Para estudo de citotoxicidade os eritrócitos ou células vermelhas do sangue são utilizados em muitos estudos relacionados à composição e ao comportamento de membrana, contribuindo com informações para estimar o comportamento de outras membranas celulares, devido, principalmente, a sua disponibilidade e acessibilidade. Além disso, qualquer alteração da membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, serve de

ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares mediante ganho de idade, exercícios físicos, dieta, etanol e praguicidas (MARIGLIANO *et al.*, 1999; MAZZANTI *et al.*, 2002; GOUVÊA; SILVA, 2006; SRINIVASAN; KEMPAIAH, 2006; BATISTA *et al.*, 2007; FIRMINO, 2007).

O eritrócito é um tipo de célula que contém alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI *et al.*, 1991). Por esta razão, espera-se que eles sejam altamente vulneráveis a reações que envolvem radicais livres e podem ser muito suscetíveis a peroxidação dos lipídios de membrana e hemólise (REDDY *et al.*, 2007). Dessa forma, constituem um poderoso sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo. Entretanto, as células possuem um eficiente sistema antioxidante no citoplasma que as tornam excepcionalmente resistentes à peroxidação quando os radicais são produzidos dentro da célula. A ocorrência de hemólise pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO *et al.*, 2005).

Os eritrócitos têm sido utilizados como modelo para avaliar o efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias permitindo obter informação sobre os efeitos destas sobre a membrana celular. A ocorrência de hemólise após a exposição ao produto teste pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como o primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro* (SCHIAR *et al.*, 2007). O metabolismo normal leva a produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ROS) que desempenham diferentes funções *in vivo*, particularmente na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular e na sinalização entre as células (ROTH, 1997). Entretanto, a produção aumentada dessas moléculas altamente reativas, se não forem rapidamente sequestradas, pode provocar a oxidação de biomoléculas (proteínas, aminoácidos, lipídios e DNA) que levam a danos celulares e a morte (IGNARO *et al.*, 1999). Vários trabalhos demonstram que as ROS estão envolvidas na asma, na inflamação, na artrite, na neurodegeneração, na doença de Parkinson, na síndrome de Down e talvez na demência (PERRY *et al.*, 2000).

Outro teste bastante utilizado e eficiente na avaliação da estabilidade das membranas, assim como na avaliação de efeitos toxicológicos é a fragilidade osmótica eritrocitária – FOE (RODRIGUES, 2009). O volume de eritrócitos no sangue parece ser regulado por uma ação direta da bomba sódio/potássio ATPase que controla a

concentração de soluto dentro da célula, regulando as forças osmóticas que pode fazer uma célula inchar ou encolher (ALBERTS *et al.*, 2002). A resistência das hemácias a hemólise caracteriza sua fragilidade osmótica eritrocitária (FOE). Ou seja, a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) expressa à habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial citotóxico das cumarinas, 1,2-benzopirona e 4-coumalrinol frente a células procarióticas e eucarióticas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antibacteriano da 1,2-benzopirona e do 4-coumarinol frente a bactérias de importância clínica.
- Avaliar o potencial citotóxico da 1,2-benzopirona e do 4-coumarinol sobre a membrana de eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O.
- Avaliar o efeito da 1,2-benzopirona e do 4-coumarinol em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O submetidos a estresse osmótico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR) do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Material

As cumarinas, 1,2-benzopirona e 4-coumarinol de *Amburana cearensis* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, Laboratório de Fitoquímica, vinculado ao Instituto de Pesquisas de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) – CCS/UFPB.

4.3 Preparação da amostra

As cumarinas 1,2-benzopirona e 4-coumarinol liofilizadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) na concentração de 10 mg/ml.

4.4 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas oriundas da Coleção de Culturas Tropicais (CCT), da American Type Culture Collection (ATCC) e de origem clínica utilizadas foram:

- *Bacillus subtilis* CCT 0516
- *Escherichia coli* ATCC 2536
- *Escherichia coli* 101
- *Escherichia coli* 104
- *Escherichia coli* 108
- *Escherichia coli* 110
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23242

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23243
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25925

4.5 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos foram oriundos de bolsas que não podem mais ser utilizadas para transfusão. As bolsas foram cedidas pela Unidade transfusional do hospital universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as normas de segurança seguidas pela referida unidade.

Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CEP-CCS N° 0410/11).

4.6 Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação do potencial citotóxico das cumarinas de *A. cearensis* frente a bactérias de importância clínica, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição. Para isso, diluições seriadas a metade de uma solução das cumarinas de *A. cearensis* (1 - 1024µg) foram adicionadas a uma suspensão (1×10^2 UFC/ml) de cada uma das linhagens em meio LB (Luria-Bertani) e em seguida incubadas a 37°C por 24h. Foi considerada como CIM a menor concentração da solução de cumarinas de *A. cearensis* que inibiu completamente o crescimento bacteriano (DAVIENNE;RADDI, 2002). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média.

4.7 Avaliação da atividade hemolítica

Avaliação do potencial citotóxico das cumarinas de *A. cearensis* em eritrócitos humanos foi realizada utilizando-se uma amostra de sangue humano que foi misturada com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspensão em NaCl 0,9% para obter uma

suspensão a 0,5%. As amostras da solução de cumarinas de *A. cearensis* em diferentes concentrações (0,1, 1, 10, 100 e 1000µg) foram adicionadas à 2 ml da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 ml. A suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise) e a suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). As amostras foram incubadas por 1 hora à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação lenta e constante a 100 rpm. Decorrido este tempo foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem.

4.8 Avaliação da atividade antihemolítica

Para avaliar o efeito das cumarinas de *A. cearensis* sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos utilizou-se uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. A solução de cumarinas de *Amburana cearensis* na concentração de 1000µg foi incubada em tubos contendo 2 ml de uma suspensão de eritrócitos por 1h a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Decorrido este tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram então ressuspensos em soluções hipotônicas de cloreto de sódio (0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84 e 0,96%) e agitadas a 100 rpm, por uma hora a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria (DU 640 BECKMAN) em comprimento de onda de 540 nm (DACIE; LEWIS, 2001). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 01: Avaliação do efeito antibacteriano da 1,2-benzopirona de *A. cearensis* frente a bactérias de importância clínica.

| LINHAGEM BACTERIANA | CIM (µg) |
|--|----------|
| <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516 | 25 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 2536 | 100 |
| <i>Escherichia coli</i> 101 | 50 |
| <i>Escherichia coli</i> 104 | 50 |
| <i>Escherichia coli</i> 108 | 6,75 |
| <i>Escherichia coli</i> 110 | 6,75 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027 | 200 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23242 | 200 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23243 | 100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25925 | 100 |

Tabela 02: Avaliação do efeito antibacteriano da 4-coumarinol de *A. cearensis* frente a bactérias de importância clínica.

| LINHAGEM BACTERIANA | CIM (µg) |
|--|----------|
| <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516 | 25 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 2536 | 200 |
| <i>Escherichia coli</i> 101 | 200 |
| <i>Escherichia coli</i> 104 | 100 |
| <i>Escherichia coli</i> 108 | 100 |
| <i>Escherichia coli</i> 110 | 100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027 | 200 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23242 | 200 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23243 | 200 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25925 | 200 |

A 1,2-benzopirona e 4-coumarinol, cumarinas de *A. cearensis* apresentaram efeito antimicrobiano para as linhagens Gram positivas e Gram negativas com concentração inibitória mínima que variou entre 6,75µg e 200µg e as bactérias de origem clínica se mostraram mais sensíveis as cumarinas do que as linhagens padrão. Este resultado é relevante uma vez que bactérias Gram positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram negativas (MADIGAN; 2004). Isso se deve ao fato de que a membrana externa das bactérias Gram negativas é uma barreira

que dificulta a entrada de várias moléculas de antibióticos e o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas vindas de fora da célula (HOLETZ *et al.*, 2002). O antibiótico que atua sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, denominados de amplo espectro, têm uma maior aplicação médica do que aqueles que atuam apenas sobre um grupo de microrganismos. Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte - CIM até 500 µg/ml, inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/ml e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/ml. Estas substâncias, então, se enquadrariam na classificação de inibidores fortes.

Avaliação do efeito hemolítico das cumarinas de *A. cearensis* frente a eritrócitos humanos.

As cumarinas de *A. cearensis* foram capazes de induzir hemólise em eritrócitos humanos pertencentes aos três tipos sanguíneos do sistema ABO, entretanto em porcentagens muito baixas (Tabela 1 e 2). Percentual de Hemólise entre 0 a 40% é considerado baixo, 40 a 80% moderado e maior que 80% alto. (RANGEL *et al.*, 1997). O efeito hemolítico não se apresentou dependente de concentração (Gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Isto é de extrema importância visto que os eritrócitos desempenham papel fundamental no transporte de gases (O₂ e CO₂) e no controle da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo. Os resultados foram expressos como média aritmética de três avaliações.

Tabela 03 - Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de *A. cearensis* em eritrócitos humanos.

| TIPO SANGUÍNEO | [µg/ml] | | | | |
|-------------------|-----------|-------|------|-------|-------|
| | 1 | 10 | 100 | 500 | 1000 |
| O | 0% | 0% | 0% | 0% | 8,7% |
| A | 8,85% | 10,2% | 15% | 14,3% | 18,5% |
| B | 8% | 3,5% | 1,8% | 6,5% | 10,1% |

Gráfico 01: Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de *A. cearensis* em sangue Tipo A

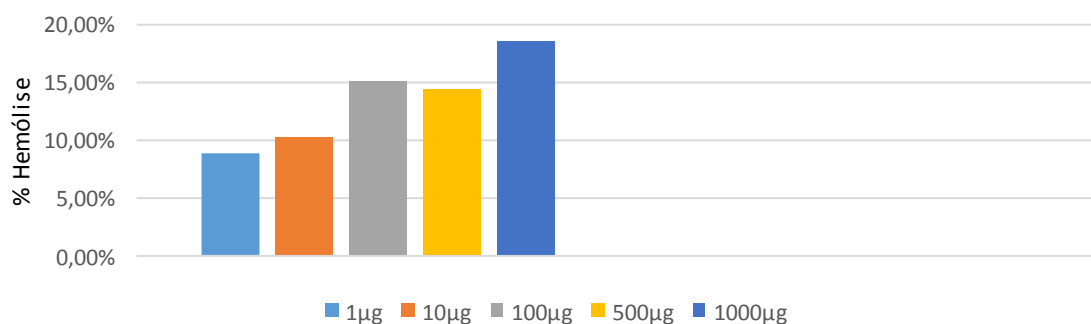


Gráfico 02: Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de *A. cearensis* em sangue Tipo B

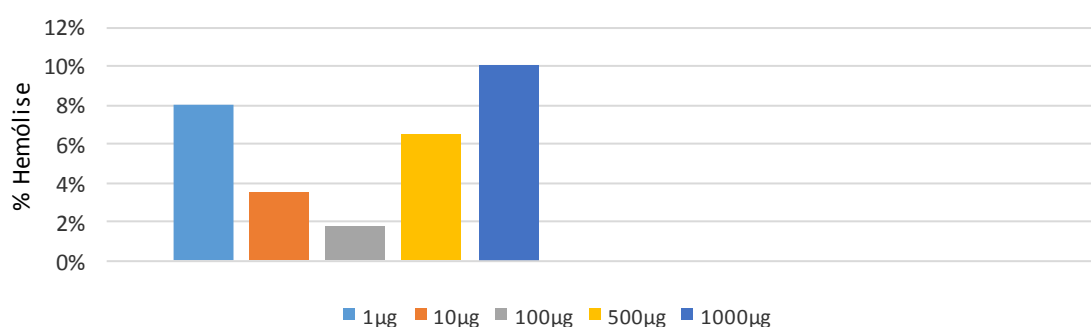


Gráfico 03: Porcentagem de hemólise promovida pela 1,2-benzopirona de *A. cearensis* em sangue Tipo O

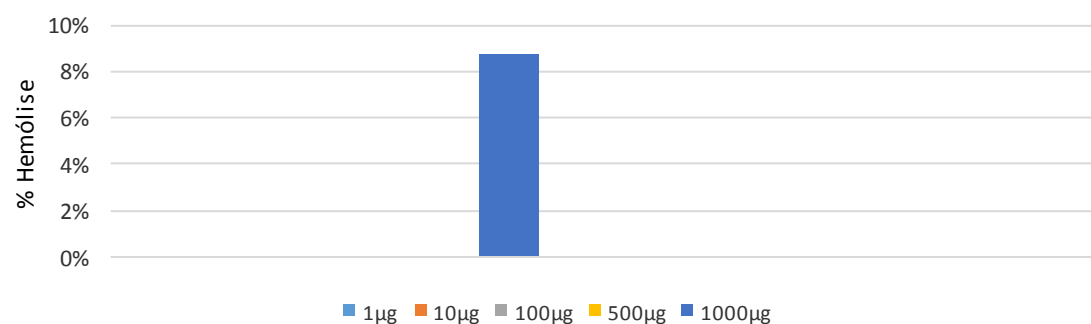
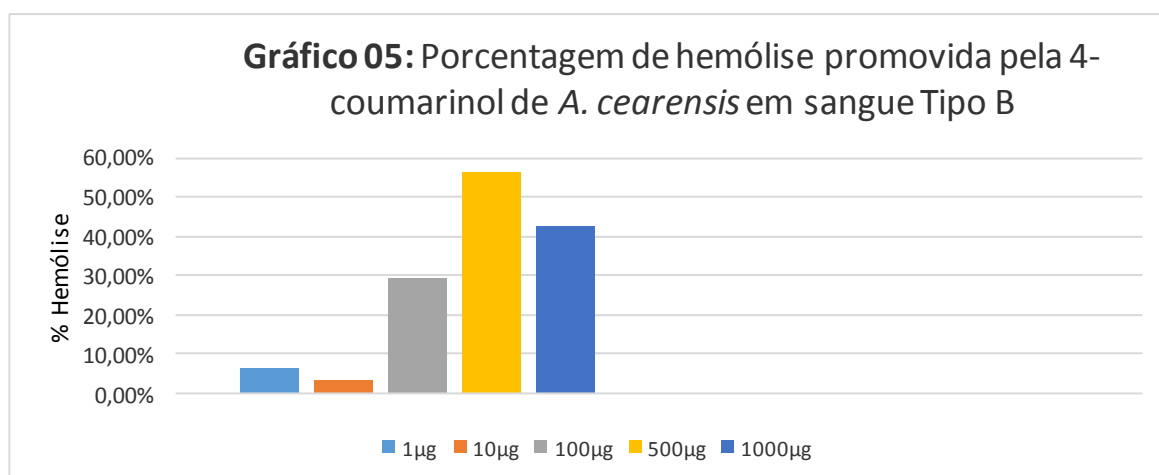
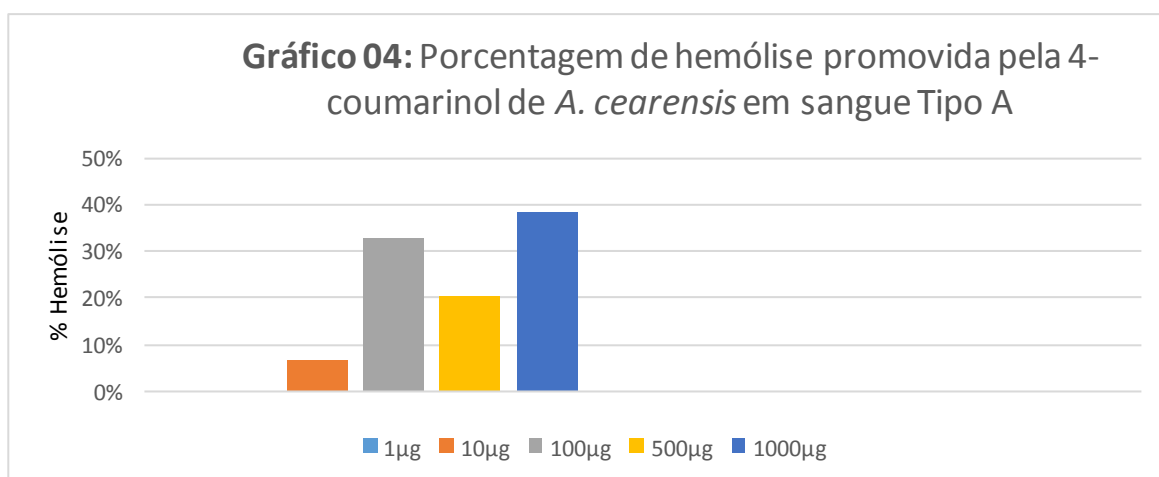
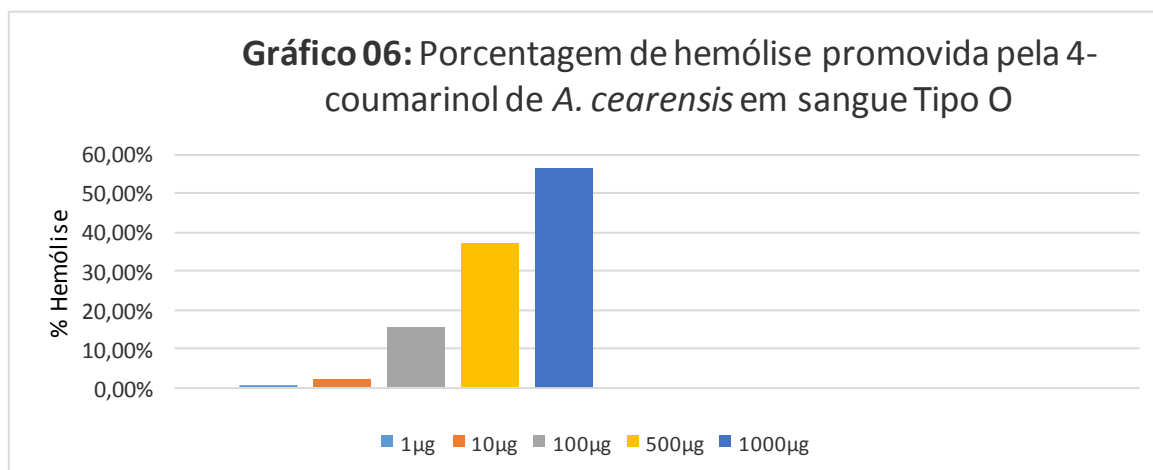


Tabela 04 - Porcentagem de hemólise promovida pela 4-coumarinol de *A. cearensis* em eritrócitos humanos.

| TIPO SANGUÍNEO | [µg] | | | | |
|----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 | 10 | 100 | 500 | 1000 |
| O | 0,9% | 2,2% | 15,7% | 37% | 56,3% |
| A | 0% | 6,5% | 33% | 20,3% | 38,6% |
| B | 6,3% | 3,35% | 29,3% | 56,4% | 42,8% |





Avaliação do efeito das cumarinas de *Amburana cearensis* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos.

Os gráficos 7,8,9,10,11 e 12 mostram os efeitos das cumarinas sobre a fragilidade osmótica eritrocitária de *A. cearensis* e estes não modificaram a fragilidade osmótica da membrana dos eritrócitos humanos dos três tipos sanguíneos (A, B e O) e portanto não reduziram significativamente a taxa de hemólise.

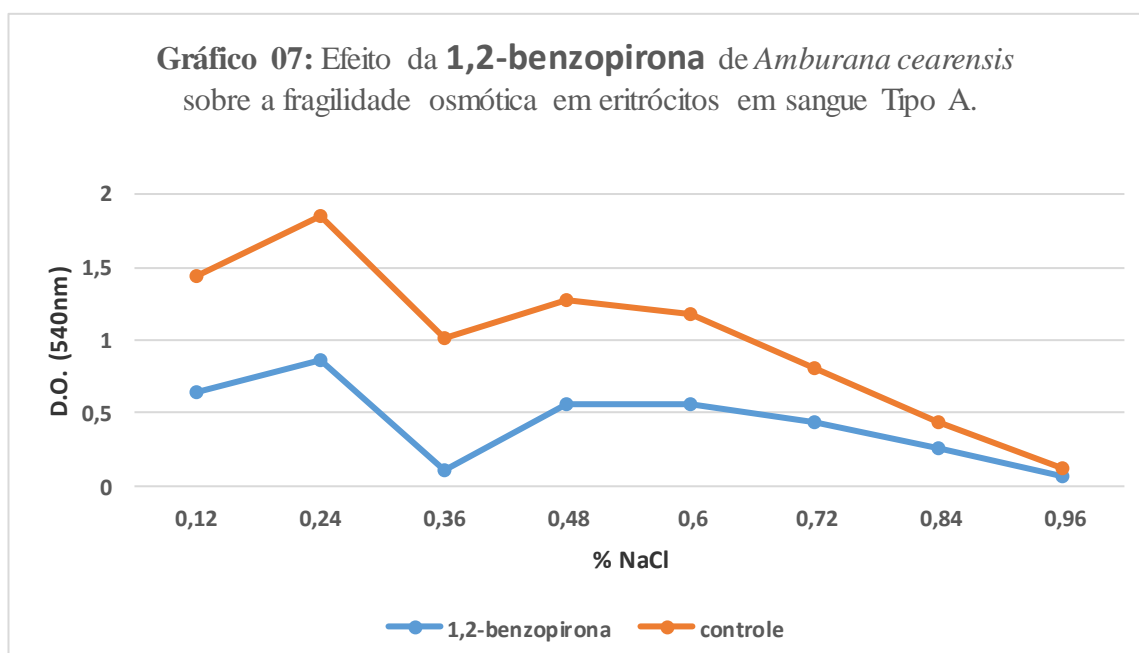


Gráfico 08: Efeito da **1,2-benzopirona** de *Amburana cearensis* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo B.

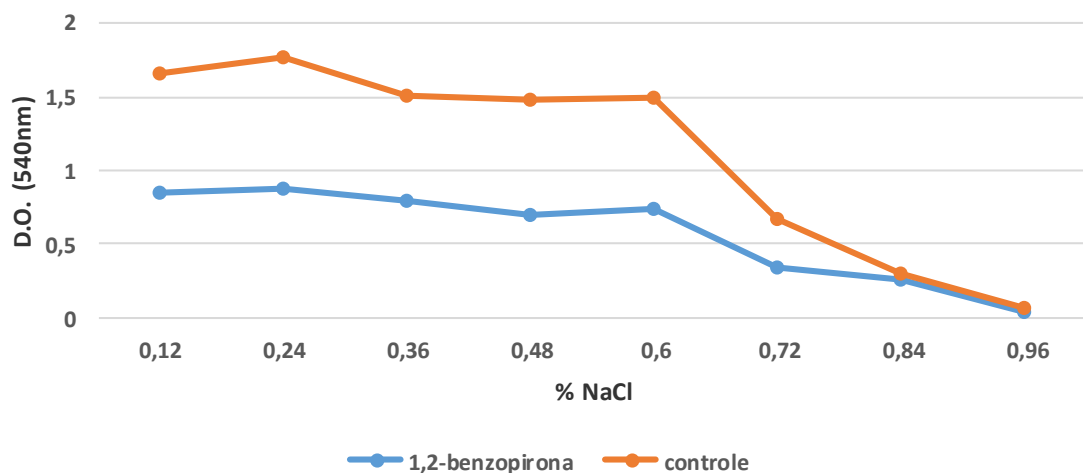


Gráfico 09: Efeito da **1,2-benzopirona** de *Amburana cearensis* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo O.

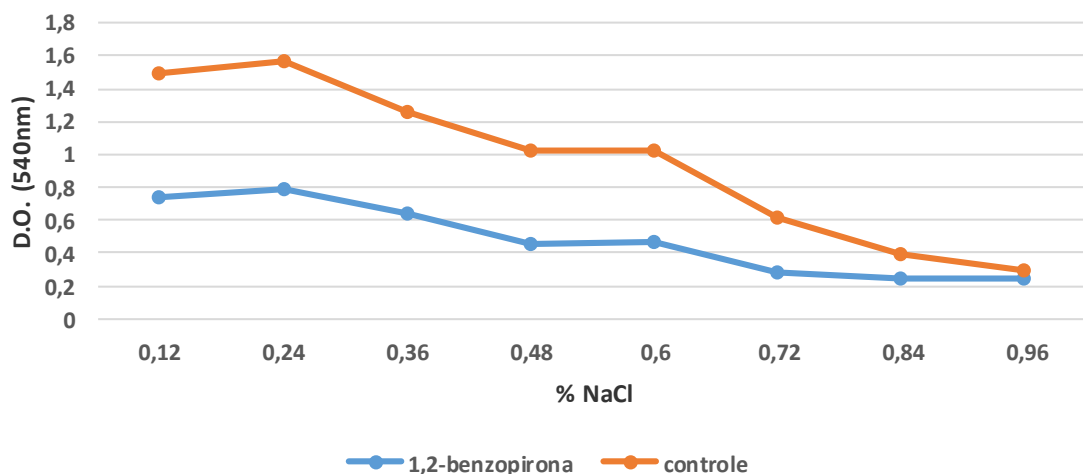


Gráfico 10: Efeito da **4-coumarinol** de *Amburana cearensis* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo B.

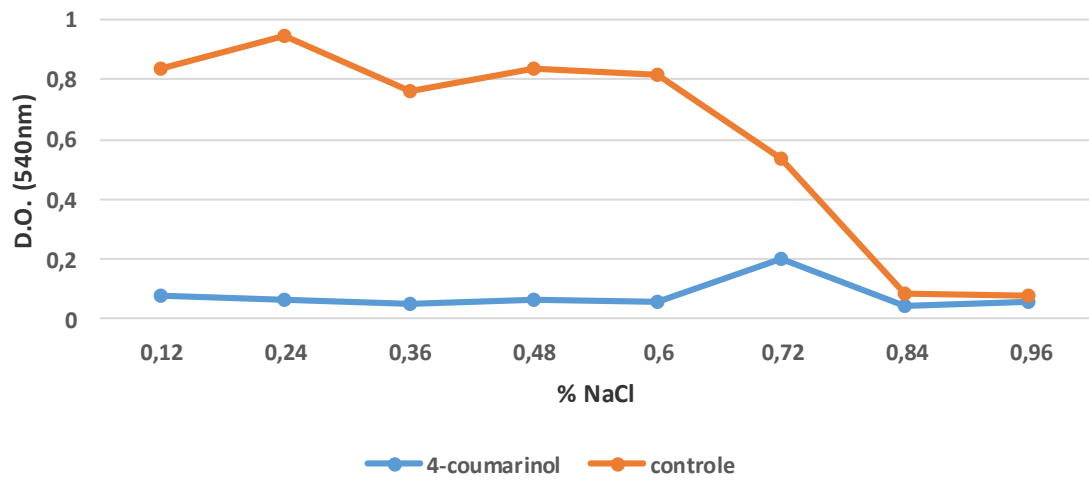


Gráfico 11: Efeito da **4-coumarinol** de *Amburana cearensis* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo A.

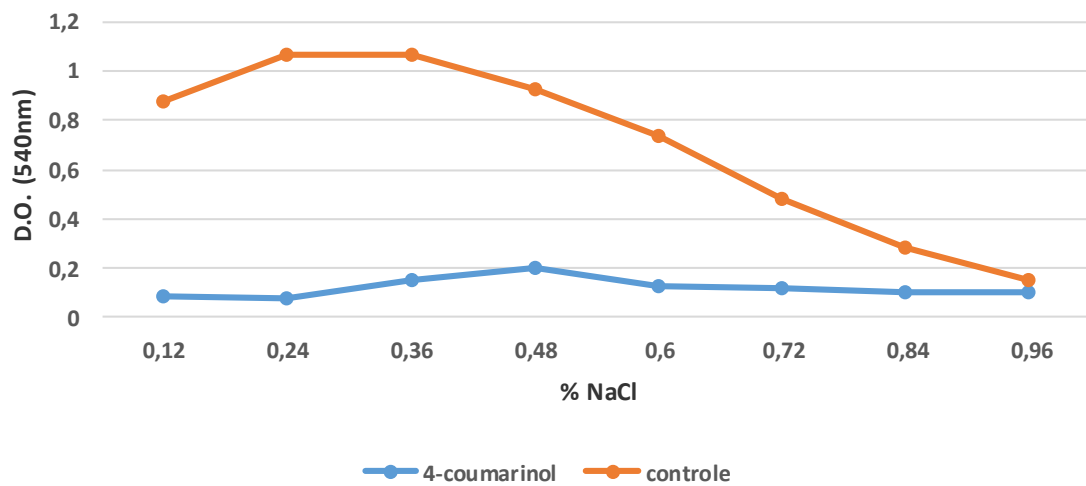
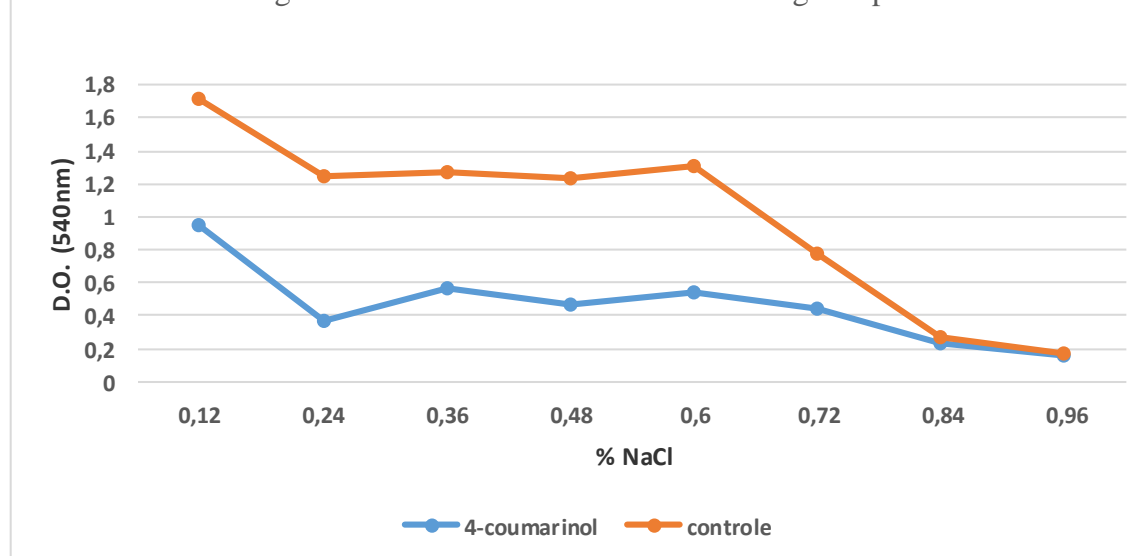


Gráfico 12: Efeito da **4-coumarinol** de *Amburana cearensis* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos em sangue Tipo O.



A integridade da membrana celular depende do tônus celular e de substâncias que podem interferir na matriz da membrana (MOUSINHO *et al.*, 2008). Várias substâncias podem modificar esse equilíbrio e se torna importante avaliar este potencial quando uma substância é candidata a aplicações farmacológicas. A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) avalia a influência qualitativa de substâncias sobre os eritrócitos (MOUSINHO *et al.*, 2008) e expressa à habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006). Alguns autores têm descrito que algumas drogas assim como alguns fitoconstituintes são capazes de induzir alterações na forma e fisiologia dos eritrócitos (AMMUS; YUNIS, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Como já foi dito as cumarinas de *A. cearensis* não modificaram a fragilidade osmótica da membrana dos eritrócitos humanos.

6. CONCLUSÕES

Na investigação citotóxica das cumarinas, 1,2-benzopirona e 4-coumarinol de *Amburana cearensis* frente a células procarióticas e eucarióticas, pode-se concluir que:

- As cumarinas inibiram fortemente o crescimento das linhagens bacterianas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, agindo portanto, sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, variando entre 6,75µg e 200µg de CIM.
- Os gêneros *Escherichia* e *Bacillus* foram os mais sensíveis para a 1,2-benzopirona e 4-coumarinol respectivamente, nas concentrações de CIM de 6,75µg e 25µg.
- As cumarinas não induziram hemólise em uma porcentagem considerável e portanto não causaram danos a membrana celular dos eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O. Variando entre 0% e 56,30%
- As cumarinas de *A. cearensis* não apresentaram efeito sobre a eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O submetidos a estresse osmótico e portanto não modificaram as propriedades fisiológicas da membrana celular.

REFERÊNCIAS

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol*, 72, 353-358, 2005.

MORALES, Ana Paula and CALDAS, Cristina. De volta à era pré-antibiótica: a busca emergencial por novos arcabouços. *Cienc. Cult.* [online]. 2010, vol.62, n.4, pp. 14-16. ISSN 2317-6660.

GONÇALVES, G. F. Avaliação das atividades citotóxica e genotóxica de taninos de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (MIMOSACEAE) João Pessoa, 88f. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Biotivos)** Universidade Federal da Paraíba. 2011.

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]. Araraquara, 92f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** Universidade Estadual Paulista. 2002.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. *Bras Patol Med Lab*, v. 48, n. 4, p. 247-249, agosto 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. **In: Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Simões, C. M. O.; Guerra, M. P. *et al.* (Orgs.) 5 ed., revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC. 2004.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, Milan, v.74, p.91-97, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, Porto Alegre, Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, Rio de Janeiro, Atheneu, 2004.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*, 35, 305-309, 1997.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSAFILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, 18, 472-508, 2008.

BRUNETON, J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

LEAL, L. K. A. M; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R.A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Phytother. Res.*, London, v. 17, p.335-340, 2003a.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267 p.

SMITH, A. C. **Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith)**. Quím. Nova, vol.33, no.3, São Paulo 2010.

MOUSINHO, K.C.; CORREIA, M. B. L.; SILVA, J. O.; MAGNATA, S. S. L. P.; SOUZA, I. A.; CATANHO, M. T. J. A. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with technetium-99m and morphology of the cells. **Braz. arch. biol. technol.** v. 51, p. 1139-1146, 2008.

CAMPOS, E. Medicina popular do nordeste: superstições, crendices e mezinhas. **Coleção razão e além de casos de coisas desse nosso estranho universo**. Rio de Janeiro, edições O Cruzeiro, Vol. 4, 3ª ed, 1967.

BATISTA, M. T. A.; RODRIGUES, H. G.; FONSECA, L. C.; BONETTI, A. M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3 (supl.)(2), 22-24, 2007.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, 26, 179 – 182, 2006.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p.4168-4170, 2001.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **JEthnopharmacol**, 114, 325-354, 2007

